

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
THE NATIONAL BOARD OF PATENTS AND REGISTRATION

Helsinki 10.12.1990

PCT/FI 91 4 00 041
73 000 F 10K 261.00

HO
W910133

Hakija
Applicant

Cultor Oy
Helsinki

REC'D 23 JAN 1991
WIPO PCT



PRIORITY DOCUMENT

Patentihakemus nro 900220
Patent application no

Tekemispäivä 15.01.1990
Filing date

Kansainvälinen luokka C 12 P 7/02
International class

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi
samanaikaisesti"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja
jäljennöksiä patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan
annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista, tiivis-
telmästä ja piirustuksesta.

This is to certify that the annexed documents are true
copies of description, claims, abstract and drawing,
originally filed with the Finnish Patent Office.

Toimistosihteeri

Markkina Huttunen
Markkina Huttunen

Leimavero 261,- mk

ప్రాణికాలి

Menetelmä ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi samanai-
kaisesti

5 Keksintö koskee menetelmää ksylitolin ja etanolin
valmistamiseksi samanaikaisesti. Lähtöaineena käytetään
hydrolysoitua lignoselluloosapitoista materiaalia, ja me-
netelmän mukaisesti lähtöaine fermentoidaan hiivakannan
avulla, minkä jälkeen etanolit otetaan talteen ja fermen-
toidulle liuokselle suoritetaan kromatografinen erotus
10 puhtaan ksylitolin saamiseksi.

15 Ksylitoli on luonnossa esiintyvä sokerialkoholi,
joka muodostuu ksyloosin pelkistysreaktiossa ja joka ma-
keudeltaan ja kaloripitoisuudeltaan (4 kcal/g) vastaa "ta-
vallista" sokeria. Ksylitoli esiintyy pieninä määrinä mo-
nissa hedelmissä ja vihanneksissa ja sitä muodostuu myös
ihmiskehossa normaalina aineenvaihduntatuotteena. Ksylito-
li on tiettyjen aineenvaihdunnallisten, hammaslääketie-
teellisten ja teknisten ominaisuuksien perusteella erit-
täin hyvä erikoismakeuttaja erilaisissa yhteyksissä. Esi-
20 merkkinä voidaan mainita, että ksylitoliaaineenvaihdunta on
riippumaton insuliiniaineenvaihdunnasta, joten myös dia-
beetikot voivat käyttää sitä. Ksylitoli vaikuttaa myös
hidastavasti suolen toimintaan, joten sillä voi olla käyt-
töä laihdutusdieeteissä. Lisäksi on haivaittu, että ksyli-
25 toli ei aiheuta hammasmätää, vaan sillä on jopa karios-
taattinen vaikutus.

30 Ksylitolin lukuisista eduista huolimatta sen käyttö
on ollut melko rajoittunutta. Syynä tähän on ksylitolin
suhteellisen korkea hinta, mikä taas johtuu vaikeuksista
tuottaa ksylitolia suuremmassa mittakaavassa.

Etanolit on hyvin tunnettu yhdiste, jolla on laaja
käyttö.

35 Ksylitolia on aikaisemmin valmistettu ksylaanipi-
toisesta materiaalista hydrolysoimalla, jolloin saadaan
monosakkaridiseos, jossa on mm. ksyloosia. Ksyloosi muute-
taan sitten ksylitoliksi, yleensä nikkelikatalysaattorin,

kuten Raney-nikkelin läsnäollessa. Lukuisia menetelmiä ksyloosin ja/tai ksylitolin valmistamiseksi ksylaanipitoisesta materiaalista on kuvattu alan kirjallisuudessa. Esimerkkinä voidaan mainita US-patenttijulkaisu 3 784 408 (Jaffe et al.), US-patenttijulkaisu 4 066 711 (Melaja et al.), US-patenttijulkaisu 4 075 406 (Melaja et al.), US-patenttijulkaisu 4 008 285 (Melaja et al.) ja US-patenttijulkaisu 3 586 537 (Steiner et al.).

Nämä tunnetut menetelmät ovat kaikki monivaiheisia, suhteellisen kalliita ja tehokkuudeltaan riittämättömiä prosessejä. Suurimpina ongelmina ovat ksyloosin ja/tai ksylitolin tehokas ja täydellinen eristäminen polyoleista ja muista hydrolyysisivutuotteista ja prosessissa runsaasti syntyvien sivutuotteiden käyttö. Puhdistus on erittäin vaativaa mm. sen takia, että ksyloosin pelkistysreaktiossa käytettävät katalyytit ovat hyvin herkkiä. Lopputuotteen puhtaus taas riippuu suuresti siitä, että ksylitoli saadaan erilleen muista pelkistysreaktiosta syntyneistä tuotteista.

On tunnettua, että useat hiivakannat tuottavat reduktaaentsyymejä, jotka katalysoivat sokerien pelkistämisen vastaaviksi sokerialkoholeiksi. Tiettyjen Candida-kantojen on esitetty tuottavan ksylitolia ksyloosista (Ditzelmuller, G, et al.: FEMS Microbiology Letters 25 (1985) 195 - 198, Kitpreechavanich, M. et al.: Biotechnology Letters vol 6 (1984) 651 - 656, Gong, C-S. et al.: Biotechnology Letters vol 3 (1981) 125 - 130). Nämä tutkimukset on kuitenkin tehty vain laboratoriomittakaavassa, eikä alan kirjallisuudessa ole esitetty menetelmiä, joissa kiteinen puhdas ksylitoli eristetään fermentaatiotuotteesta.

Hakijan rinnakkaishakemukseissa US 297 791, jätetty 17.1.1989, kuvataan menetelmä puhtaan kiteisen ksylitolin valmistamiseksi kasvimateriaalista käyttäen hydrolyysin ja fermentoinnin jälkeen kromatografista erottamista. Tässä

menetelmässä kuitenkin suurin osa raaka-aineesta menetetään arvottomana jätemateriaalina. Mikäli suurempi osa raaka-aineista voitaisiin muuttaa kaupallisiksi tuotteiksi, tämä oleellisesti parantaisi kokonaismenetelmän taloudellisuutta.

5 Tiedetään, että etanolia voidaan valmistaa selluloosasta ja hemiselluloosasta fermentoimalla sopivan hiivakannan avulla. Etanolin valmistusta D-ksyloosista on kuvattu esimerkiksi US-patenttijulkaisussa 4 368 268 (C-S. 10 Gong), joka erityisesti kohdistuu mutanttien aikaansaamiseen, jotka tuottavat etanolia suurin saannoin, ja julkaisussa Biotechnology and Bioengineering Symp. 12 (1982) 91 - 102, McCracken, L. & Gong, C-S., jossa fermentointi suoritetaan termotoleranttien hiivojen avulla.

15 Nyt on havaittu, että ksyilitolia ja etanolia voidaan tuottaa samanaikaisesti käyttäen keksinnön mukaisista menetelmää, jossa ksyloosi muutetaan ksyilitoliksi, kun taas suurin osa raaka-aineessa olevista muista heksooseista muutetaan etanoliksi. Näin raaka-ainetta käytetään tehokkaasti hyödyksi, ja saadaan kahta kaupallisesti erittäin tärkeätä tuotetta puhtaina ja korkealla saannolla. Menetelmä on yksinkertainen ja tehokas.

20 Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että hydrolysoitu lähtöaine fermentoidaan hiivakannan avulla, muodostunut etanolit otetaan talteen, jäljelle jääneelle ksyilitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja puhdas ksyilitoli kiteytetään. Lähtöaineena käytetään ksyloosipitoisia materiaaleja, jotka keksinnön mukaisesti fermentoidaan hiivakannan avulla, joka pystyy muuttamaan ksyloosin ksyilitoliksi ja useimmat heksoosit etanoliksi. Fermentoinnin avulla saadaan runsaasti ksyilitolia sisältävä liuos, josta ksyilitoli otetaan talteen yksinkertaisella tavalla. Työläitä ja monimutkaisia erosuvaiheita (kuten perinteistä ioninvaihtoa, demineralisointia, saostuksia tms) ei tarvita, vaan yleensä ksyilito-

li voidaan puhdistaa yhdessä vaiheessa kromatografisesti, minkä jälkeen se kiteytetään puhtaan ksylytolin saamiseksi. Etanol on helppo poistaa fermentointiliuoksesta esimerkiksi haihduttamalla. Näin vältetään tarve erottaa ksylytoli heksitoleista ja muista sokereista, jotka ovat muodostuneet hydrolyysi- ja pelkistysvaiheissa. Keksinnön mukaisesti suoritettu hydrolyysi tarjoaa myös ratkaisun muissa menetelmissä jätemassana poistetun sulpun käytölle, joten eksinnön mukaisessa menetelmässä oleellisesti koko lähtömateriaali hyödynnetään.

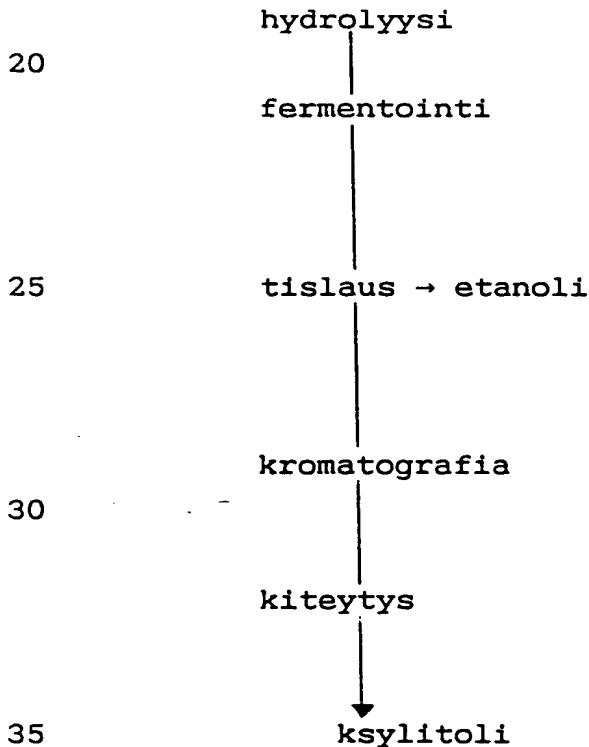
Lähtömateriaalina eksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan käyttää melkein mitä tahansa ksylyanipitoista materiaalia. Mahdollisia lähtöaineita ovat mm. lehtipuut, kuten koivu, pyökki, poppeli, leppä ym. ja kasvit tai kasvien aineosat, kuten vehnän, maissin, kauran tai ohran oljet tai kuoriosat, maissintähkät ja -varret, pähkinänkuoret, sokeriruohon murskausjäte (bagassi) ja puuvilla-siementen kuoret. Käytettäessä puuta lähtömateriaalina, se edullisesti pienennetään tai käytetään hakkeena, sahapuruna ym. ja käsittellään hydrolysoimalla tai höyryräjäytysmenetelmällä ja jälkihydrolysoimalla, jolloin saadaan eksinnössä käyttökelpoista hiilihydraattimateriaalia.

Edellä mainittujen lisäksi voidaan käyttää esimerkiksi puumassan käsittely- ja valmistusprosesseissa muodostuneita runsaasti ksylyania tai ksyloosia sisältäviä sivutuotteita. Esimerkkinä mainittakoon puumassan valmistuksessa sulfiittiprosessin avulla syntyvä hapan sulfiittijäteliemi, joka sisältää pieniä määriä liukenevittomia puun kiintoaineita, sekä liukoisia aineita, kuten lignosulfonaatteja, heksooseja ja pentooseja, mukaan lukien ksyloosi, ja on hyvä raaka-aine käytettäväksi ksylytolin valmistuksessa. Paperin ja puumassan prosessoinnissa syntyneitä muita sivutuotteita ja jätetuotteita, kuten esimerkiksi esihydrolysaatteja viskoosimassan valmistuksesta ja ns. neutraalisulfiittiprosessin jäteilentä, jotka sisältävät paljon ksylyania ja/tai ksyloosia voidaan myös käyttää.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään vesi-
 liuosta, joka sisältää vapaata ksyloosia. Näin ollen saat-
 taa olla tarpeen suorittaa lähtömateriaalille hoppo- ja/
 5 tai entsyyymihydrolyysi ksylaanin hajottamiseksi ksyloosik-
 si. Menetelmiä ksylaanipitoisten materiaalien hydrolysoi-
 miseksi ksyloosipitoisten liuosten saamiseksi on kuvattu
 esimerkiksi US-patenttijulkaisuissa 3 784 408 (Jaffe et
 al.) ja 3 586 537 (Steiner et al.).

10 Lähtömateriaali voidaan haluttaessa esikäsittellä
 ennen fermentointia sellaisten aineosien poistamiseksi,
 jotka saattavat olla hiivalle myrkyllisiä tai muilla ta-
 voin haitallisia. Esikäsittelyvaiheen tarpeellisuus riippuu
 15 käytetystä lähtömateriaalista ja fermentoinnissa käytetystä hiivasta. Lähtömateriaalin esikäsittely voi käsit-
 tää esimerkiksi jälkihydrolyysin, kromatografisen erotuk-
 sen, ioninvaihtopuhdistuksen, saostuksen tms.

Prosessikaavio on esitetty seuraavassa:



Hydrolyysi voi käsittää kaksi vaihetta, selluloo-
 sapitoisen raaka-aineen esihydrolyysin, joka voidaan suo-
 rittaa käyttääns. höyryräjäytysmenetelmää, sekä poly- ja
 oligosakkaridien entsymaattisen hydrolyysin vastaavien
 5 monosakkaridien muodostamiseksi. Tämä vaihe suoritetaan
 entsyyymien avulla, joilla on korkea sellulolyyttinen ja
 ksylanolyyttinen aktiivisuus.

Jäljelle jääneet kiinteät aineet, koostuen suurilta
 osin ligniinistä, erotetaan sitten saadusta liuoksesta.
 10 Vaihtoehtoisesti mainitut kiinteät aineet ja fermentoin-
 nissa syntyvät kiinteät aineet, kuten hiiva, voidaan
 erottaa tai ottaa talteen seuraavan tislauksen jälkeen.

Kun raaka-aineena käytetään suhteellisen epäpuhtai-
 ta liuoksia, saattaa liuosten esikäsittely joissakin ta-
 15 pauksissa olla tarpeen. Esikäsittely voi olla esimerkiksi
 jälkihydrolyysi ja/tai aineosien erottaminen, jotka aine-
 osat voivat olla käytetylle hiivalle myrkyllisiä ja/tai
 haitallisia tai joilla on haitallinen vaikutus fermentoin-
 tiin tai erotusvaiheisiin. Esikäsittelyyn voi myös liittyä
 20 kromatografinen erotus, ioninvaihtopuhdistus, saostus tms.

Seuraavaksi liuos fermentoidaan sopivan hiivakannan
 avulla. Keksinnössä käytetään hiivoja, jotka pystyvät pel-
 kistämään ksyloosin ksyilitoliksi ja heksoosit etanoliksi
 ja/tai käyttävät heksooseja kasvuun. Tällaisia hiivoja
 25 ovat mm. *Candida*-, *Pichia*-, *Pachysolen*- ja *Debaryomyces*-
 sukuihin kuuluvat hiivat. Edullisina pidetään *Candida*- ja
Debaryomyces -lajeja, erityisesti *Candida tropicalis* ja
Debaryomyces hansenii. Hyvä esimerkkinä voidaan mainita
 30 *Candida tropicalis* -kanta, joka on talletettu talletuslai-
 tokseen the American Type Culture Collection numerolla
 ATCC 9968.

Fermentoitavan vesiliuoksen ksyloosipitoisuus riip-
 puu käytetystä lähtömateriaalista ja prosessivaiheista,
 mutta on edullisesti noin 50 - 300 g/l.

35 Fermentointi voidaan suorittaa useimmissa kaupal-
 lisesti saatavissa fermenttoreissa, jotka on varustettu

ilmastusvälineillä ja sekoitus- ja pH-säätelyvälineillä. Lämpötila on edullisesti noin 20 - 40 °C, erityisen edullisesti noin 30 °C. Hiivasolut lisätään korkean ksyloosipitoisuuden liuokseen. Yleisesti voidaan sanoa, että mitä suurempi on hiivakonsentraatio, sitä nopeampi on fermentointivaihe. On havaittu, että hiivakonsentraatio on edullisesti noin 1 - 20 g kuivaa hiivaa/l substraattia (kuivapainoa) kun ksyloosipitoisuus on noin 50 - 300 g/l.

Fermentointia voidaan tehostaa lisäämällä ravinteita ja sitä jatketaan kunnes suurin osa ksyloosista on muutettu ksylitoliksi ja olennaisesti kaikki heksoosit on muutettu etanoliksi ja/tai käytetty hiivan kasvuun. Fermentointi kestää yleensä noin 24 - 144 tuntia, edullisesti 24 - 72 tuntia. Keksinnön mukaisella menetelmällä jopa 90 % ksyloosista voidaan muuttaa ksylitoliksi.

Fermentoinnin jälkeen liuos kirkastetaan ennen ksylitolin ja etanolin erottamista siitä. Hiivasolut poistetaan fermentoinnin jälkeen. Tämä voidaan suorittaa sentrifugoimalla, suodattamalla tai muulla samankaltaisella menettelyllä. Kun hiivasolut on poistettu ja liuos on kirkas otetaan fermentoinnissa syntynyt etanol talteen hahduttamalla, tislaamalla tai muulla samankaltaisella menettelyllä. Hiivasolujen poisto voidaan vaihtoehtoisesti suorittaa tislauksen jälkeen.

Ksylitolin talteenottamiseksi suoritetaan ensin kromatografinen erotus. Tämä tehdään edullisesti kolonnissa, joka on täytetty divinylibentseenillä ristisidotulla sulfonoidulla polystyreenihartsilla alkali/maa-alkalimuidossa. Tarkoitukseen sopivaa suuren mittakaavan kromatografiamenetelmää on kuvattu US-patentijulkaisussa 3 928 193 (Melaja et al.). Kromatografinen erotus voidaan suorittaa myös käyttäen simuloitua liikkuvaa petiä, kuten on kuvattu US-patentijulkaisussa 2 985 589. Kolonniin täytteenä käytetään DVB-ristisidotua sulfonioitua polystyreenihartsia.

Kromatografiavaiheessa saadusta runsaasti ksylitolia sisältävästä fraktiosta ksylitolitoli voidaan kiteyttää hyvällä saannolla käyttäen tavanomaisia kiteytysmenetelmiä, kuten jäähdytys- tai haihdutuskiteytystä. Käytettäessä 5 jäähdytyskiteytystä konsentroituun ksylitoliliuokseen lisätään siemenkiteiksi ksylitolikiteitä, joiden keskimääräinen läpimitta on noin 30 mikronia, minkä jälkeen liuoksen lämpötilaa alennetaan hitaasti. Saadut kiteet, joiden 10 keskimääräinen läpimitta on noin 250 - 600 mikronia, erotetaan esimerkiksi sentrifugoimalla ja pestäään vedellä oleellisesti puhtaan kiteisen ksylitolin saamiseksi.

Menetelmä voidaan vaihtoehtoisesti suorittaa siten, 15 että lähtöaineelle suoritetaan osittainen hydrolyysi ja uutto. Uutosta saatu esihydrolysaatti fermentoidaan sitten ksyloosin muuttamiseksi ksylitoliksi, joka erotetaan kromatografiseksi ja kiteytetään edellä kuvatulla tavalla. Uutetulle massalle suoritetaan loppuhydrolyysi, hydrolysisituote fermentoidaan heksoosien muuttamiseksi etanoliksi ja etanolit otetaan talteen edellä kuvatulla tavalla.

20 Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavien esimerkkien avulla, joiden tarkoituksena ei ole rajoittaa keksintöä.

Esimerkki 1

25 Etanolin ja ksylitolin valmistus koivulastuista

Koivulastuille suoritettiin höyryräjäytyskäsittely 215 °C:ssa viiveajalla 4,5 min. Käytetty laitteisto on kaupallisesti saatavissa (Stake Technology, Canada).

30 30 kg höyryräjäytämällä esikäsiteltyjä lastuja suspendoitiin 400 l:aan vettä 50 °C:ssa sekoitusvälineillä varustetussa reaktorissa. Suspension pH säädettiin arvoon 4,8 NaOH-liuoksella. Seuraavat entsyymit lisättiin reaktoriin:

	Cellulase Multifect L 250 (Cultor)	4 FPU/g k.a.
5	beta-Glucosidase Novozyme 188 (Novo)	5 IU/g k.a.
10	Hemicellulase Multifect K, (Cultor) sisältäen	ksylanaasia 18 U/g ka B-ksylosidaasia 9 nkat/g ka esteraasia 2 nkat/g ka

15 Reaktio aloitettiin ja 3 ja 6 tunnin jälkeen seokseen lisättiin esikäsiteltyjä koivulastuja kiinteiden aineiden pitoisuuden nostamiseksi 14 paino-%:iin. Hydrolyysiä jatkettiin 3 vrk 50 °C:ssa ja pH-arvossa 4,8. Saanto hydrolyysin jälkeen oli 16 % glukoosia ja 12 % ksyloosia laskettuna esikäsiteltyjen lastujen kuivapainosta.

20 Liuos erotettiin kuiva-aineesta dekantointisentrifuugissa (Sharples P 600). Hienojakoinen aine poistettiin Westfalia Na7-06-076 -separaattorissa ja ksyloosi-glukosiliuos konsentroitiin hahduttamalla. Konsentraatin pH oli 5,1 ja koostumus oli seuraava:

25	glukoosi	10,3 %
	ksyloosi	7,6 %
	muita monosakkarideja	3,1 %
	oligosakkarideja	5,5 %

Kiinteiden aineiden kokonaismäärä oli noin 32 %.

30 Liuos sisälsi lisäksi orgaanisten happojen suoloja ja pieniä määriä ligniinin hajoamistuotteita, furfuraalia, fenoleja ja muita orgaanisia aineita.

35 Hydrolysoitu tuote fermentoitiin hiivalla *Candida tropicalis* ATCC 9968. Fermenttorina käytettiin New Brunswick Scientific Co If 250 -fermenttoria johon oli liitetty kaasuanalyysi- ja massaspektrometritaitteistot.

Fermentointiliuoksessa oli:

60 l	esihydrolysaattia (kuiva-ainepitoisuus noin 32 %)
5 1,5 kg	Gistex-hiivauutetta (höyrysteriloitu 121 °C, 15 min)
29 l	vettä

10

Siirrostusviljelmät kasvatettiin kahdessa vaiheessa, ensin 2 l erlenmeyerpulloissa Orbital Shaker -ravistelijassa 30 °C:ssa, 2 vrk ja sitten Microgen SF 116 -laboratoriofermenttorissa, jonka käyttötilavuus oli 11 l. 15 Fermenttoria ilmastettiin nopeudella 5,5 Nl/min (0,5 VVM) ja sekoitettiin nopeudella 500 RPM. Kasvatus kesti 1 vrk.

20 Varsinainen fermentointi suoritettiin pilot -mittakaavassa käyttötilavuuden ollessa 100 l. Fermenttoria ilmastettiin nopeudella 20Nl/ min (0,2 VVM) ja sekoitettiin nopeudella 100 rpm. Lämpötila pidettiin 30 °C:ssa ja pH-arvo 6:ssa. Vaahtoamisen säätelyaineena käytettiin Plurioria®.

Fermentointitulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

<u>aika (h)</u>	<u>hiiva (g/kg)</u>	<u>ksyllitoli (g/l)</u>	<u>glukoosi (g/l)</u>	<u>etanolii (g/l)</u>
0	2,0	0,0	53,5	1,9
16	6,1	2,9	2,4	26,4
23,5		4,7		26,7
41,0	7,4	9,0	1,9	25,6
65,0	8,0	15,8		24,9
91,5	6,1	21,2		23,4
136		20,6		22,3

Fermentoinnin jälkeen oleellisesti kaikki sokerit olivat muuttuneet ksylitoliksi tai etanoliksi.

5 Etanolit otettiin talteen liuoksesta tislaamalla fermentoitu liuos tavanomaisella tavalla. Tislauslaitteisto koottiin vakiorakenneosista (Corning Process Systems), jotka olivat borosilikaattilasia ja laitteisto käsitti välineet 15 erotusvaihetta varten seuraavasti: kiehutin, 13 kellopohjaa ja syöttöpohja 4. ja 5. kellopohjan välissä ylhäältä lukien. Kolonin halkaisija oli 10 cm.

10 Tislaus suoritettiin paineessa 110 mbar syöttönpesuella 10 l/h ja palautussuhteella 3:1. 110 l:sta fermentointiliuosta saatiin 7,0 kg tislettä, joka sisälsi 27,1 paino-% etanolia. Pohjatuotteen etanolipitoisuus oli 0,02 paino-%.

15 Ksylitolin erotus ja kiteytys tapahtui esimerkeissä 2 ja 3 kuvatulla tavalla.

Esimerkki 2

Etanolin ja ksylitolin valmistus sulfiittijäteliemestä

20 Lähtöaineena käytettiin sulfiittijäteliemestä kromatografisesti erottettua sokerijetta (FI 862273, US 4 631 129), joka sisälsi huomattavan määrän heksooseja, pääasiassa glukoosia. Liuoksen koostumus ennen fermentointia ja sen jälkeen on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2

	<u>aineosa</u>	<u>ennen fermentointia</u>	<u>fermentoinnin jälkeen</u>
30	kuiva-aine paino-%	19,0	-
	oligosakk. % k.a.	14,8	10,3
	glukoosi	90,0	1,4
	ksyloosi	42,0	3,5
	arabinoosi	5,0	2,3
35	ksylitolit	-	25,4
	etanolit	-	42,0
	arabinitoli	-	2,8

5 Fermentointi suoritettiin *Debaryomyces hansenii* - kannalla ja väliaineeseen lisättiin 3 g/l hiivauutetta, 3 g/l mallasuutetta ja 5 g/l peptonia. Fermentoitavan liuoksen pH oli alussa noin 6,0, lämpötila oli noin 30 °C ja fermentointi suoritettiin Orbital Shaker -ravistelijassa (200 rpm).

10 10 Fermentoinnissa syntynyt etanolit otettiin talteen tislaamaalla (50 °C, 200 mbar) ja jäljelle jäähneelle liuokselle suoritettiin kromatografinen erotus divinyylibentseeni-ristisidotulla polystyreenirunkoisella kationinvaihtajalla täytetyssä kolonnissa, jolloin käytettiin seuraavia olosuhteita:

kolonnin korkeus	4,0	m
kolonnin läpimitta	22,5	cm
15 lämpötila	65	°C
virtausnopeus (H ₂ O)	30	1/h
syöttöpitoisuus	30	paino-%
syöttökoko	6	kg kuiva-ainetta
hartsi: Finex C 09		
20 palloskoko	0,37	mm
ionimuoto	Na ⁺	

25 25 Tulokset on esitetty graafisesti kuviossa. Ksylitolit erottettiin ksyloosista ja muista epäpuhtauksista ja otettiin talteen korkean ksylitolipitoisuuden omaavasta fraktiosta, josta puhdas ksylitolit kiteytettiin esimerkisä 3 kuvatulla tavalla.

Esimerkki 3

Ksylitolin kiteytys

30 30 Kromatografisesti rikastetusta ksylitoliliuoksesta, joka sisälsi 82,5 % ksylitolia kuiva-aineesta, ksylitolit kiteytettiin haihduttamalla liuos 92 p-% kuiva-ainetta sisältäväksi 65 °C:ssa. Liuokseen, jota oli 2 200 g luonnonpainoa, ympättiin 0,03 p-% kuiva-aineesta noin 0,04 mm

kokoisia ksylitolikiteitä, ja liuos jäähdytettiin 55 tunnissa 45 °C:een seuraavan empiirisen yhtälön mukaisesti:
 $T = T_1 - (t/t_1)^{**2} * (T_1 - T_2)$, missä

5 T = liuoksen lämpötila, °C
 T₁ = siemennyslämpötila (65 °C)
 T₂ = loppulämpötila (45 °C)
 t = aika siemennyksestä, h
 t₁ = kiteytysaika (55 h)

10

Kiteytys suoritettiin vertikaalisella sekoittajalla varustetussa 2 litran pilot -kiteyttimessä. Liuoksessa olevasta ksylitolista kiteytyi 65 % raakakiteinä, jotka erotettiin emäliuoksesta korisentrifugilla (Hettich, Roto Silenta II).

Linkouksen aikana kiteitä pestiin vedellä (4 % vettä kiteiden painosta). Linkousaika oli 5 min ja käytettiin 2 000 g:n keskipakovoimaa. Kidesuspensiota lingottiin 1 510 g luonnonpainoa, mistä saatiin 705 g kuiva-ainetta kidettä, jonka ksylitolipitoisuus oli 99,4 % kuiva-aineesta. Kiteiden keskikoko oli 0,37 mm ja standardipoikkeama 24 %.

Raakakiteet voidaan uudelleenkiteyttää tuotekiteiksi FI-patenttijulkaisussa 69296 esitetyllä tavalla.

25

Esimerkki 4

Etanolin ja ksylitolin valmistus ohrankuorista

Lähtöaineena käytettiin ohrankuorimassaa, jonka hiilihydraattikooostumus oli seuraava:

30 ksylaani 21,6 % k.a.
 glukaani 33,4
 arabinaani 5,7
 galaktaani 1,4
 mannaani 0,6
 35 ramnaani 0,2

Ohrankuorimassa hydrolysoitiin paineessa 350 psi 235° C:ssa ja viiveaika oli 2,0 min. Hydrolysoitu materiaali sisälsi 46,6 % kuiva-ainetta ja liuonneiden kiintien aineiden pitoisuus oli 34,2 % kuiva-aineesta. Suodos 5 sisälsi kuiva-aineesta laskettuna monosakkarideja 12,7 %, etikkahappoa 16,9 % ja furfuraalia 0,5 %. Suodokselle suo-10 ritettiin jälkihydrolyysi säätämällä pH arvoon 1 rikkipapolla ja hydrolysimalla liuosta 4 h yhden ilmakehän paineessa 100 °C:ssa. Jälkihydrolysaatin koostumus oli seuraava:

oligosakkarideja	1,3 % k.a.
monosakkarideja	45,2 %
	- ksyloosi 67,3 % monosak-
	- arabinoosi 11,4 % kari-
15	- glukoosi 16,0 % deista
	- galaktoosi 3,3 %
	- mannoosi 1,5 %
	- ramnoosi 0,5 %
muita	3,3 % k.a.

(mm. furfuraalia)

20

Jälkihydrolysaatin fermentointi, etanolin talteenotto ja ksylitolin kiteytys tapahtui edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla.

25

Esimerkki 5

Etanolin ja ksylitolin valmistus kaurankuorista

Lähtöaineena käytettiin kaurankuorimassaa, jonka hiilihydraattikoosumus oli seuraava:

ksylaani	26,5 % k.a.
30	glukaani 30,7 %
	arabinaani 3,0 %
	galaktaani 1,3 %
	mannaani 0,2 %

Kaurankuorimassa hydrolysoitiin paineessa 350 psi 235° C:ssa ja viiveaika oli 2,0 min. Hydrolysoitu materiaali sisälsi 39,1 % kuiva-ainetta ja liuonneiden kiinteiden aineiden pitoisuus oli 36,4 % kuiva-aineesta. Suodos sisälsi kuiva-aineesta laskettuna monosakkarideja 12,0 %, etikkahappoa 12,9 % ja furfuraalia 0,5 %. Suodokselle suoritettiin jälkihydrolyysi säätämällä pH arvoon 1 rikkihapolla ja hydrolysoimalla liuosta 4 h yhden ilmakehän paineessa 100 °C:ssa. Jälkihydrolysaatin koostumus oli seuraava:

oligosakkarideja	1,3 % k.a.
monosakkarideja	63,1 %
	- ksyloosi 69,0 % monosak-
	- arabinoosi 6,9 % kari-
15	- glukoosi 19,1 % deista
	- galaktoosi 3,1 %
	- mannoosi 0,8 %
	- ramnoosi 1,1 %
muita	2,8 % k.a.

(mm. furfuraalia)

20

Jälkihydrolysaatin fermentointi, etanolin talteenotto ja ksylitolin kiteytys tapahtui edellisissä esimerkeissä kuvatulla tavalla.

25

Esimerkki 6

Koivulastujen höyryräjäytys ja uutto

Koivulastuille suoritettiin höyryräjäytyskäsittely tehdasmittakaavaisella laitteistolla lämpötilassa 215 °C viiveajalla 4,5 min. Käytetyn laitteiston valmistaja on Technip, laitetyyppi StakeII system.

30 35 Höyryräjäytystuote lietettiin kuumaan prosessiveen sekotussäiliössä n. 3,5 % kuitususpensioksi. Sieltä liete ohjattiin ylijuoksun kautta tasaiseksi kerrokseksi vastavirtaperiaatteella toimivalle 5-vaiheiselle nauhasuotimelle (tyyppi A 40-B25; valmistaja Filters Philippe;

kangasviiran leveys oli 2,7 m, viira oli laitteen valmistajan toimittama). Viiralla kiinteää massaa uutettiin edelleen kuumalla vedellä.

Saadussa vesiliuoksessa oli:

5	kuiva-ainepitoisuus	8,7	paino-%
	ksyloosimonomeereja	1,1	% luonnonpainosta
	ksyloosioligomeereja	3,7	"
	glukoosia	0,04	"

10 Esimerkki 7

Höyryräjytetyn vesipestyn koivulastumassan entsymäattinen hajottaminen

15 Hydrolyysin raaka-aineena käytetyn höyryräjytetyn (215 °C/4,5 min) koivulastumassan (valmistettu esimerkin 6 mukaisesti) koostumus oli seuraava:

kuiva-ainetta	32 %
selluloosaa	60 % k.a.:sta
ksylaania	3,6 % "
ligniiniä	25 % "
20 (asetoniin uuttuva)	
Klason ligniini	12,3 % "

25 Edellä kuvattua massaa punnittiin 90 kg sekoittajalla ja lämmitysvaipalla varustettuun reaktiosäiliöön, jossa oli 370 litraa vettä. Seos lämmitettiin 50 °C:een, pH säädettiin arvoon 4,8 - 5,0, minkä jälkeen lisättiin entsyymiliuokset (1,24 l Multifect L 250, 0,11 l Novozyme 188 ja 0,09 l Multifect K). Lisäysmäärät vastaavat aktiivisuusyksikköinä sellulaasia 6 FPU/g, β -glukosidaasia 5 IU/g ja hemisellulaasia (ksylanaasia 18 U/G k.a., β -ksylosidaasia 9 nkat/g k.a., esteraasia 2 nkat/g k.a.) 0,02 ml kasvuliuosta/g massan kuiva-ainetta. Reaktion annettiin jatkua edellä kuvatuissa olosuhteissa 18 tunnin ajan. Tällöin lisättiin massaa ja entsyymejä samat määrät kuin aloitusvaiheessa. Vastaava massan ja entsyymin lisäys

toistettiin 21 tunnin kuluttua aloituksesta. Tämän jälkeen hydrolyysireaktion annettiin jatkua niin että kokonaisaika oli 40 tuntia. Entsyytmien toiminta pysäytettiin tällöin lämmittämällä massaseos 80 °C:een 10 - 20 minuutin ajaksi.

5 Samalla myös jäljelle jänyt kiintoaines kiinteytyy ja on helpommin erotettavissa. Kiintoaine ja liuos erotettiin toisistaan sentrifugoimalla (Pennvalt Sharples P 600 -malli). Liuos kirkastettiin vielä erottamalla jäljelle jänyt hieno sakka separaattorilla (Westfalia malli NA7-06-076).

10 Liuos konsentroitiin 33 %:iin fermentointia varten haiduttamalla Luwa -haihduttajalla vakuumissa 40 - 50 °C:een lämpötilassa.

Höyryräjäytetyn vesipestyn koivulastumassa hydrolyysisaannot entsyymikäsittelyssä:

15	% liuoksessa	saanto % k.a:sta	konversio %
glukoosi	3,3	24,5	40,8
ksyloosi	0,4	2,6	72,0
oligosakkaridit	0,7		

20 Kirkastetun ja haihdutetun entsyymihydrolysaattiliuoksen koostumus:

glukoosia	22,7 %	luonnonpainosta
ksyloosia	2,7 %	"
oligosakkaridit	4,7 %	"

25

Esimerkki 8

Höyryräjäytetyn vesipestyn koivulastumassa entsyy-
maattisen hydrolysaatin fermentointi etanoliksi

Hydrolysoitu selluloosa fermentoitiin hiivalla

30 Candida tropicalis ATCC 9968. Fermenttorina käytettiin New Brunswick Scientific IF-250 -fermenttoria.

Fermentointiliuoksessa oli:

45	1	hydrolysaattia
1,5	kg	Gistex-hiivauutetta
35	40	vettä

Siirrostusviljelmät kasvatettiin kahdessa vaiheessa, ensin 2 l erlenmeyerpulloissa Orbital Shaker -ravistelijassa 30 °C:ssa 2 vrk, sitten New Brunswick Scientific SF-116 -laboratoriofermenttorissa, jonka käyttötila-
5 vuus oli 11 l. Fermenttoria ilmastettiin 5,5 Nl/min (0,5 vvm) ja sekoitettiin nopeudella 500 rpm. Kasvatus kesti 1 vrk.

Varsinainen fermentointi tehtiin pilot -mittakaavassa käyttötilavuuden ollessa 100 l. Fermenttoria ilmastettiin 25 Nl/min (0,25 vvm) ja sekoitettiin nopeudella 100 rpm. Lämpötila säädettiin 30 °C:een ja vaahdon-
10 amista kontrolloitiin Pluriol -vaahdonestoaaineella.

Fermentoinnin tulokset on esitetty taulukossa 4.

15

Taulukko 4

	aika (h)	solumassa (g/l)	glukoosi (g/l)	etanol (g/l)
	0	1,8	105,0	1,9
	19,5	11,3	0	51,2
20	52	-	0	48,1
	66	-	0	45,0

Hiiva kulutti 29,5 h aikana kaiken alustassa olevan glukoosin tehden siitä etanolia 48 % saannolla.
25 Fermentoinnin jälkeen hiivasolut erotettiin liuoksesta sentrifugoimalla (Westfalia NA7-06-076). Kirkastettu liuos tislattiin etanolin talteenottoa varten.

30

Esimerkki 9

Etanolin talteenotto höyryräjäytetyin, vesipestyn
koivulastumassan entsymaattisen hydrolysaatin fer-
mentointituotteesta
Tislattavana oli 100 litraa fermentoitua selluloo-
sahydrolysaattia. Fermentointi oli tehty esimerkissä 8
35 kuvatulla tavalla ja kirkastettu sentrifugoimalla Westfa-

lia NA7-06-076 -separaattorilla. Liuoksen etanolipitoisuus oli 3,4 %.

Tislauslaitteisto oli koottu Corning Process Systemsin vakiorakenneosista, jotka olivat borosilikaattilasia. Kolonnin halkaisija oli 10 cm. Laitteistossa oli 5 15 erotusvaihetta: kiehutin, 13 kellopohjaa ja syöttöpohja 4. ja 5. kellopohjan välissä ylhäältä lukien. Tislaus tehtiin paineessa 100 mbar, syöttönopeudella 10 l/h ja 10 palautussuhteella 3:1. Talteen saatiin 8,5 kg tislettä, jonka etanolipitoisuus oli 36,0 %. Pohjatuotteen etanolipitoisuus oli 0,1 %.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi samanaikaisesti hydrolysoidusta lignoselluloosapitoisesta materiaalista, tunnettu siitä, että lähtöaine fermentoidaan hiivakannan avulla, muodostunut etanolit otetaan talteen, jäljelle jääneelle ksylitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja puhdas ksylitol kiteytetään.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että lähtöaine uutetaan, uutettu liuos fermentoidaan ksyloosin muuttamiseksi ksylitoliksi ja ksylitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja kiteytyys ja uutetulle massalle suoritetaan loppuhydrolyysi, se fermentoidaan ja muodostunut etanolit otetaan talteen.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että lähtöaineena käytetään ksylaania sisältävää lignoselluloosaa, kuten koivua tai viljankuorta.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että lähtöaineena käytetään sulfiittijätelientä.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että hiivakanta pystyy muuttamaan vapaan ksyloosin ksylitoliksi ja läsnäolevat vapaat heksoosit etanoliksi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että hiivakanta kuuluu Candida- tai Debaryomyces -sukuun.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 6 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että hiiva on Candida tropicalis -laji, ja on edullisesti Candida tropicalis ATCC 9968.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että hiiva on Debaryomyces hanse- nii -laji.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
tunnetaan siitä, että etanolit otetaan talteen tis-
laamalla.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
5 tunnettu siitä, että hydrolyysi suoritetaan höy-
ryräjätyksellä ja entsymaattisella loppuhydrolyysillä.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
tunnetaan siitä, että kromatografinen erotus teh-
dään käyttäen stationäärisenä faasina vahvaa kationin-
10 vaihtohartsia.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
tunnetaan siitä, että fermentointi suoritetaan pH-
arvossa noin 4 - 7, edullisesti noin 5,7 ja lämpötilassa
noin 10 - 45 °C, edullisesti noin 25 - 35 °C.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
15 tunnettu siitä, että uutetun massan loppuhydro-
lyysi tehdään entsymaattisesti.

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää ksylitolin ja etanolin valmistamiseksi samanaikaisesti hydrolysoidusta lignoselluloosapitoisesta materiaalista, jolloin lähtöaine fermentoidaan hiivakannan avulla, muodostunut etanolit otetaan talteen, jäljelle jääneelle ksylitoliliuokselle suoritetaan kromatografinen erotus ja puhdas ksylitolit kietytetään.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förfarande för samtidig framställning av xylitol och etanol från ett hydrolyserat lignocellulosahaltigt material, varvid utgångsmaterialet fermenteras med en jäststam, etanolen som bildats tillvaratas, den resterande xylitolösningen separeras kromatografiskt och ren xylitol kristalliseras.

KROMATOGRAFINEN EROTUS

